

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-178661

(43)Date of publication of application : 11.08.1986

(51)Int. Cl. G01N 33/569

A61K 39/00

C12Q 1/00

(21)Application number : 60-020570

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 05.02.1985

(72)Inventor : SHINAGAWA KUNIHIRO

WATANABE KOJI

TANABAYASHI KIYOSHI

MATSUZAKA NAONORI

HANIYU TSUNEO

ANDO MINORU

(54) QUANTITATIVE ANALYSIS OF ENTEROTOXIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To solve the cause of food poisoning by rapidly and accurately measuring the enzymatic activity of the labelled antibody bonded or unbonded to a carrier, by reacting an enterotoxin-containing solution with an anti-enterotoxin antibody insolubilizing carrier and an enzyme labelled anti-enterotoxin antibody.

CONSTITUTION: Bacteria, for example, a staphylococcus is cultured and purified staphylococcus enterotoxin A is obtained from the supernatant of the culture medium. A rabbit is immunized with this enterotoxin A to obtain anti-enterotoxin anti-serum from which an anti-enterotoxin antibody is, in turn, obtained.

Thereafter, this antibody is bonded to an inert carrier to obtain an antibody insolubilizing carrier while said antibody is labelled, for example, by a peroxidase marker to obtain a labelled antibody. A food causing food poisoning is homogenized with a physiological saline solution and the homogenate is centrifugally separated to obtain a supernatant. The antibody insolubilizing carrier and the labelled antibody are simultaneously or separately reacted with the obtained supernatant to measure the activity of the marker of either one of the labelled antibody bonded to the insolubilizing carrier or the unbonded labelled antibody. The measured value is compared with the standard obtained from a specimen with known enterotoxin concn. to know the concn. of enterotoxin in the specimen. By this method, measurement is enabled rapidly and accurately with high sensitivity.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision
of rejection]

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-178661

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)8月11日

G 01 N 33/569

A 61 K 39/00

C 12 Q 1/00

7906-2G

8214-4C

8213-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全12頁)

⑮ 発明の名称 エンテロトキシンの定量法

⑯ 特 願 昭60-20570

⑰ 出 願 昭60(1985)2月5日

特許法第30条第1項適用 昭和59年10月23~24日開催の「第38回日本細菌学会東北支部総会」において文書をもって発表

⑱ 発 明 者	品 川	邦 汎	盛岡市月が丘2丁目8番12号
⑱ 発 明 者	渡 辺	浩 二	盛岡市西下台町12番14号
⑱ 発 明 者	棚 林	清	盛岡市前九年3丁目14番30号
⑱ 発 明 者	松 坂	尚 典	盛岡市西松園1丁目2番16号
⑱ 発 明 者	羽 生	恒 男	敦賀市東洋町9番2-106号
⑱ 発 明 者	安 藤	實	敦賀市東洋町9番4号
⑰ 出 願 人	東洋紡績株式会社		大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

明

細

書

1. 発明の名称

エンテロトキシンの定量法

2. 特許請求の範囲

(1) エンテロトキシン含有液を抗エンテロトキシン抗体不溶化担体および酵素標識抗エンテロトキシン抗体と反応させ、結合した酵素標識抗エンテロトキシン抗体または未結合の酵素標識抗エンテロトキシン抗体の酵素活性を測定することにより、エンテロトキシンを定量することを特徴とするエンテロトキシンの定量法。

(2) エンテロトキシン含有液を抗エンテロトキシン抗体不溶化担体と反応させ、エンテロトキシン-抗エンテロトキシン抗体不溶化担体複合体を形成し、次いで該複合体と酵素標識抗エンテロトキシン抗体と反応させ、該複合体と結合した酵素標識抗エンテロトキシン抗体の酵素活性を測定することにより、エンテロトキシンを定量することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のエンテ

ロトキシンの定量法。

(3) エンテロトキシン含有液を酵素標識抗エンテロトキシン抗体と反応させ、エンテロトキシン-酵素標識抗エンテロトキシン抗体複合体を形成し、次いで該複合体と抗エンテロトキシン抗体不溶化担体を反応させ、該担体に結合した酵素標識抗エンテロトキシン抗体の酵素活性を測定することにより、エンテロトキシンを定量することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のエンテロトキシンの定量法。

(4) エンテロトキシン含有液と酵素標識抗エンテロトキシン抗体複合体と抗エンテロトキシン抗体不溶化担体とを同時に反応させ、該担体に結合した酵素標識抗エンテロトキシン抗体の酵素活性を測定することにより、エンテロトキシンを定量することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のエンテロトキシンの定量法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はエンテロトキシンの定量法に関し、特

に食品中に混入したブドウ球菌あるいはセレウス菌の産生する毒素（以下エンテロトキシンと略す）を検出する方法に関するものである。

特に食品衛生検査上、食中毒を生じせしめたエンテロトキシン究明を行う際、食品及び患者材料（吐物）中に存在するエンテロトキシンを正確に定量することにより、食中毒の診断を行うものである。

（従来の技術）

従来からエンテロトキシンの定量法としては次のような方法が行なわれている。食中毒を生じさせたと推定される食品10gを90mlの生理食塩水あるいはリン酸緩衝生理食塩水（以下PBSと略す）にてホモジネートし、その0.1mlをマンニトー食塩—卵黄寒天培地に塗抹し、37℃で24～48時間培養を行い、生じたコロニーを計測して、食品1g中の菌数を出す。食品1g中の菌数が10個以上の場合、菌による食中毒と推定される。次いで、コアグラゼ産生性を10倍希釈ウサギブラズマ0.5μlにプレーンハートインフ

ュージョン培地（以下BHIと略す）培養被検菌5μlを加え、3～24時間後、ブラズマの凝固又は、フィブリンの析出が認められるかどうか判定し、凝固した場合には黄色ブドウ球菌と同定される。

さらに黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシンを測定する場合、被検菌を3%NZ-アミン培地又はBHI培地で振盪培養し、培養液を遠心後、ミクروسライドゲル内沈降反応法により、一方にエンテロトキシンを動物に免疫して得た抗血清を入れ、他方に培養遠心上清を倍數希釈してそれぞれの穴に入れ、48時間温箱中で反応させ、抗血清を入れた穴と各希釈液との間に沈降線の有無を判定する。あるいはエンテロトキシンに対する抗血清をポリエチレン等のラテックスに結合させたものを用いて培養上清を倍數希釈し、凝集を示す最高希釈倍数を求め、本方法の最少検出感度によりエンテロトキシンを求めるラテックス凝集反応が用いられている。

（発明が解決しようとする問題点）

このように食中毒の原因解明には、食品中の菌の分離、同定、エンテロトキシン量の定量といった一連の操作は繁雑で、簡単に行なうことは不可能であつた。本発明者等は、食品中のエンテロトキシンを直接定量する高感度で、しかも簡便な方法を開発すべく鋭意研究した結果本発明に到達した。

（問題点を解決するための方法）

すなわち本発明は、エンテロトキシン含有液を抗エンテロトキシン抗体不溶化担体および酵素標識抗エンテロトキシン抗体と反応させ、結合した酵素標識抗エンテロトキシン抗体または未結合の酵素標識抗エンテロトキシン抗体の酵素活性を測定することによりエンテロトキシンを定量することを特徴とするエンテロトキシンの定量法である。

エンテロトキシンは黄色ブドウ球菌の産生する嘔吐活性毒素に対して与えられた固有名詞と理解されてきたが、近年コレラ菌、大腸菌、ウエルシエ菌の下痢性毒素もエンテロトキシンと呼ばれる

ようになつた。そこで、従来よりのエンテロトキシンは菌名を付してブドウ球菌エンテロトキシンと呼ぶようになつた。本発明はこれらの全てのエンテロトキシンの定量を含有しているものである。

ブドウ球菌食中毒は菌体外毒素により発生する疾患であることが、1930年代に Dacks [Dack, G.W., Cary, W.E., Woolpert, O., Wiggings, H.J. : J. Prev. Med., 4, 167, (1930)] によつて証明され、このエンテロトキシンが単離精製された。このブドウ球菌エンテロトキシンにはA, B, C, D及びEの5つのタイプが存在することも明らかにされている。これらの5つのタイプは、従来の技術の項で述べたようなゲル内沈降反応により、特異的沈降パターンにより区別することが可能であり、5つのタイプの中にも、共通抗原が存在することも又明らかである。これらのエンテロトキシンの分離、精製法は別冊、蛋白質、核酸、酵素11, 88 (1976)に詳細に記載されているように培養上清を出発原料にしてCM-セファローズカラムク

ロマトグラフィー、セファデックスG-100、セファデックスG-75によるゲル濾過を繰返し行う操作が多く用いられる。

本発明に用いられる抗エンテロトキシン抗体は次のようにして得ることができる。すなわち、上記のようにして分離、精製したエンテロトキシンに対する抗血清を得るには、例えばエンテロトキシン80 μ g/ml, 0.6mlとフロイドの完全アジュバンド0.1mlを等量混合しウサギ皮下に注射し、さらに6~7週後に追加免疫し、最初の免疫より10~11週目で全採血する。得られたエンテロトキシンに対する抗血清の力価、純度はゲル内沈降反応により検定する。

このようにして得られたエンテロトキシンに対する抗血清を用いて、抗体画分を通常の3%飽和硫酸塩析-DEAEセファローズカラムクロマトグラフィーによりIgG画分を得る。又別法としてプロテインA結合セファローズCL-4Bに抗血清を通し、PBSで洗浄後吸着されたIgGを、グリシン-塩酸緩衝液pH2.7を用いて溶出する。

溶出後、直ちに2Mトリスアミノメタンで中和後、PBSに対し一夜透析することによりIgGに精製することもできる。さらに動物より得られる抗血清以外でもハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体も利用することができる。

このようにして得た抗エンテロトキシンのIgG画分を不溶性担体に結合する方法としては物理吸着を利用しても良く、又通常蛋白質あるいは酵素を不溶化するに用いられる方法を用いて共有結合させても良い。例えば不溶性多糖類を用いる場合であれば、不溶性多糖を臭化シアン、過ヨード酸ナトリウム、エピクロロヒドリン1,1'-カルボニルジイミダゾール等で活性化して結合反応を行なわせる。又、固相に適当なスパーサーを導入後、スパーサーを介して抗エンテロトキシン抗体を結合させても良い。

本発明で使用する抗エンテロトキシン抗体は、IgG画分をそのまま用いても良いが、抗原結合部位のみを分離したものでも良い。即ち、ババイン、ペプシンなどのプロテアーゼで処理して得ら

れるFab, Fab', F(ab')₂、部分なども使用することができる。

本発明の不活性担体としては、ポリスチレン等のプラスチック、ガラスあるいはアガロース、デキストラン、セルロース等の多糖類が使用でき、形態としては、ビーズ状、繊維状、チューブ状等種々の形態が利用できる。又、酵素を標識剤としてIgG画分に結合させる方法としてグルタルアルデヒドを架橋剤として用いる方法(Avrames, S.; *Immunochimistry*, 8, 43-52, 1969)及びペルオキシダーゼを標識剤として用いるNakaneの過ヨード酸酸化法(Nakane, P.K., & Kawaoi, I.; *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084-1091, 1974)、さらに β -ガラクトシダーゼを標識剤とし、マレイミドを架橋剤として用いる方法(加藤兼房、石川栄治: 免疫実験操作法、IV, 1975 P1137)により、標識酵素と抗体のIgG画分あるいはFab, Fab', F(ab')₂を結合させることができる。

標識酵素としては、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼのほかアルカリホスファター

ゼ、グルコールオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等通常用いられる酵素であればいずれでも良いが、特にペルオキシダーゼが、測定感度が高いために好ましい。

又、酵素基質-発色剤としては、一般に用いられているものが使用可能であり、ペルオキシダーゼの場合には、過酸化水素とo-フェニレンジアミン $\cdot 2HCl$ 、過酸化水素と2,2'-アジノ-ジ-(3-エチレンベンチアゾリンスルホン酸 ④)とが、感度の点より用いられ、又、蛍光基質として過酸化水素と3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸(HPPAと略す)も使用可能であり、 β -D-ガラクトシダーゼの場合、o-ニトロフェニル β -D-ガラクトシドあるいは蛍光基質として4-メチルウンベリフェリル β -D-ガラクトシドを用いることができる。さらにアルカリホスファターゼの場合には、p-ニトロフェノール・リン酸や蛍光基質としての4-メチルウンベリフェリル・リン酸の使用もできる。

本発明の定量法はエンテロトキシン含有液を抗

エンテロトキシン抗体不溶化担体および酵素標識抗エンテロトキシン抗体と反応させ、結合した酵素標識抗エンテロトキシン抗体または未知の酵素標識抗エンテロトキシン抗体の酵素活性を測定することにより、エンテロトキシン定量する方法である。

具体的には次のような方法がある。

(1) エンテロトキシン含有液を抗エンテロトキシン抗体不溶化担体と反応させ、エンテロトキシン-抗エンテロトキシン抗体不溶化担体複合体を形成し(第1段反応)、次いで該複合体と酵素標識抗エンテロトキシン抗体を反応させ(第2段反応)、該複合体と結合した酵素標識抗エンテロトキシン抗体の酵素活性を測定することにより、エンテロトキシンを定量する。

(2) エンテロトキシン含有液を酵素標識抗エンテロトキシン抗体と反応させ、エンテロトキシン-酵素標識抗エンテロトキシン抗体複合体を抗エンテロトキシン抗体不溶化担体を反応させ(第2段反応)、該担体に結合した酵素標識抗エンテロ

トキシン抗体の酵素活性を測定することにより、エンテロトキシンを定量する。

(3) エンテロトキシン含有液と酵素標識抗エンテロトキシン抗体複合体と抗エンテロトキシン抗体不溶化担体とを同時に反応させ、該担体に結合した酵素標識抗エンテロトキシン抗体の酵素活性を測定することにより、エンテロトキシンを定量する。

上記反応は温度4~45℃、特に37℃付近で行なうことが好ましく、反応pHは中性付近、特にpH7~7.5付近であることが好ましい。酵素活性測定は酵素の至適pH付近で行なうことが好ましい。反応時間は特に制限はないが、逐次反応法の(1)および(2)においては、第1段反応を約30分~約2時間あるいは一夜放置後、第2段反応を約30分~約2時間あるいは一夜放置する。同時反応法の(3)においては、約10分~約5時間反応させる。反応温度、反応pHおよび反応時間は必要により変化してもよい。

酵素活性測定は結合した酵素標識抗エンテロト

キシンの酵素活性に代えて未結合の酵素標識抗エンテロトキシン抗体の酵素活性を測定してもよい。

検体中に存在するエンテロトキシンの量は予め作製した標準曲線により正確にかつ高感度で測定する。

(発明の効果)

本発明では、微生物の産生したエンテロトキシンを簡便で、迅速な操作により正確に測定でき、食中毒原因解明ができる。

(実施例)

次に実施例により本発明を説明する。

(1) 精製ブドウ球菌エンテロトキシンAの調製品川らの方法〔日細誌30,683,(1975)〕により調製した。即ち黄色ブドウ球菌FRI-722を用い3%NZアミン-プロテインヒドロラーゼ(以下PHPと略す)培地を用い、16~18時間振盪培養し、遠心分離により培養上清を得、6N-HClでpHを5.7に調製した。4倍量の蒸留水で希釈したものを0.01Mリン酸緩衝液pH5.7で平衡化した

CM-セファデックスによるバッチクロマトを行い、カラムにつめpH5.7の0.01Mリン酸緩衝液で洗浄後、pH5.7の0.01Mリン酸緩衝液とpH7.5の0.1Mリン酸緩衝液でグラジエント溶出した。次いで0.025Mグリシン-NaOH緩衝液pH9.5で平衡化したDEAE-セファデックスカラムクロマトにかけ、0.025Mグリシン-NaOH緩衝液pH9.5と0.2MNaClを含む0.05Mグリシン-NaOH緩衝液pH9.5でグラジエント溶出し、セファデックスG-75ゲル濾過後、精製水に対し透析後、凍結乾燥し、精製ブドウ球菌エンテロトキシンAとした。

(2) ブドウ球菌エンテロトキシンAに対する抗血清

ブドウ球菌エンテロトキシンAに対する抗血清は精製ブドウ球菌エンテロトキシンAを初回10μg(0.5ml)とフロイドの完全アジュバンド(0.5ml)を混ぜ、1mlのウサギの背部皮下に接種した。7~9週目にブースターとしておのおの同量のブドウ球菌エンテロトキシンAをアジュバ

ントを加えないで皮下に免疫した。力価が最高になった11～13週に採血した。

③ 抗ブドウ球菌エンテロトキシンA抗血清よりのIgG画分の調製

得られたブドウ球菌エンテロトキシンAに対するウサギ抗血清をプロテインA結合セファローズCL-4B(ファルマシア製)をつめたカラムに通し、0.01M PBSで洗浄し、波長280nmにおける吸光度が0.050以下になった段階で0.1Mグリシン-HCl緩衝液pH2.7を通し、プロテインA結合セファローズCL-4Bに結合しているIgG画分を溶出させた。溶出後、すぐに2Mトリスアミノメタンを用いて中和し、0.01M PBS (pH7.2) に対し透析する。透析後精製抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGとして使用に供した。

(4) F(ab')₂ フラグメントの調製

抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGにペプシン(ブタ腸粘膜由来、シグマ社製)10W/V%を加え、37℃、16時間処理し、セファデックスG-200ゲル濾過によりF(ab')₂ フラグメ

ントを得た。

⑤ 抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGをペルオキシダーゼの結合体の調製

過ヨウ素酸塩酸化法(Nakane, P.K., & Kawaoi, A.; J. Histochem. Cytochem. 22, 1084-1091, (1974))により、抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGと西洋ワサビペルオキシダーゼ(東洋紡製、グレードI-C)を結合し、セファデックスG-200ゲル濾過により、ペルオキシダーゼ標識抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGを得た。

⑥ 抗体結合固相の調製

抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGを1/4インチポリスチレンボールに物理吸着させた。即ち、抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGを0.1M炭酸緩衝液pH8.5に20～30μg/mlに調製した液にポリスチレンボールを浸漬し、室温4時間、4℃、液放置した。0.01M PBS (pH7.2) で洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)、0.1% PBS (pH7.2) に使用まで保存した。

抗体結合固相は、少なくとも6カ月は安定であった。

(7) 測定操作

標準ブドウ球菌エンテロトキシンAは、精製ブドウ球菌エンテロトキシンAを、0.01M PBSに、所定濃度になるように溶解調製したものをを用いた。標準ブドウ球菌エンテロトキシンA液、100μlあるいは、食中毒を生じさせた食品10gを生理食塩水90mlに溶解ホモジネートし、遠心分離した。上清100μlを、内径10mm、高さ30mmの試験管が20個結合したイムノボルトレー(小野薬品工業社製)の中に入れ、正常家兎血清4V/V%を含む、0.01M PBS pH7.2、200μlを追加混合後、抗体結合ボールを1ヶ入れ、37℃で、1時間、静置インキュベートした。1時間後、アスピレーターを用いて、液を吸引除去し、0.01M PBS pH7.2を用いて3回洗浄後、0.25W/V% BSAを含む、0.01M PBS pH7.2で適当に希釈した。希釈したもの(標準ブドウ球菌エンテロトキシンA 100ng/mlを用いた場合に

吸光度が1.0付近になるように調製する。)

25000l加え、37℃、2時間、インキュベートした。インキュベート終了後、0.01M PBS pH7.2を用いて3回洗浄後、新たな試験管ボックス(イムノボール・スピッツボックス)にボールのみ移し、0.02% H₂O₂、o-フェニレンジアミン・2HCl(半井化学社製)3mg/ml含む、0.2Mクエン酸、0.1Mリン酸緩衝液pH5.7、0.5mlを加え、暗所、室温で1時間反応させた。

1時間後、1N-硫酸2mlを加え酵素反応を停止後、波長492nmでの吸光度を測定した。得られたブドウ球菌エンテロトキシンAの標準曲線を第1図に示す。食品中のブドウ球菌エンテロトキシンAは、この標準曲線より求められた。又、ブドウ球菌エンテロトキシンの他の型、即ちB、C、D、Eについて、そのエンテロトキシン濃度を10000ng/mlとしたときの交差程度は、Eのみ20ng/ml程度検出され2%程度の交差反応を示した。

実施例 2

(I) 精製ブドウ球菌エンテロトキシン B の調製

精製ブドウ球菌エンテロトキシン B の調製は実施例に示したような品川らの方法によつて調製した。即ち、黄色ブドウ球菌 243 (*staphylococcus aureus* 243) 株を用い、3% N Z - アミン加え、3% P H P 増地を用いて振盪培養し、遠心分離により培養上清を得、6 N - H C l で pH 5.7 に調製後、蒸留水で 5 倍に希釈した。次いで C M セフアデックスパッチ法クロマトグラフィー、D E A E - セフアデックスカラムクロマトグラフィーおよびセフアデックス G - 75 によるゲル濾過を行い、精製水に対し透析後、凍結乾燥し、精製ブドウ球菌エンテロトキシン B を得た。

(2) ブドウ球菌エンテロトキシン B に対する抗血清

実施例 1 で示したブドウ球菌エンテロトキシン A に対する抗血清作製法と同一の操作を行いエンテロトキシン B に対する抗血清を得た。

(3) 抗ブドウ球菌エンテロトキシン B 抗血清よりの IgG 画分の調製

黄色ブドウ球菌 (*staphylococcus aureus*) FRI - 381 を用い、実施例 1 と同じような方法で培養し、遠心分離により得た培養上清に精製水を加え、希釈後、pH を 5.7 にし C M - セフアデックスを加え、エンテロトキシン C を吸着後、カラムにつめ、0.01 M リン酸緩衝液 pH 5.7 で洗淨後 0.01 M リン酸緩衝液 pH 5.7 と 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.5 を用いてグラジエント溶出する。次いで、0.025 M グリシン緩衝液 pH 9.5 で平衡化した D E A E - セルロースによるクロマトで 0.025 M グリシン緩衝液 pH 9.5 と 0.2 M N a C l 加え、0.05 M グリシン緩衝液 pH 9.5 によるグラジエント溶出し、セフアデックス G - 75 によるゲル濾過後、凍結乾燥を行うことにより、精製エンテロトキシン C を得た。

(2) 測定材料の調製

ブドウ球菌エンテロトキシン C に対する抗血清は、実施例 1、実施例 2 に記載の方法に準じて作製し、又、精製 IgG 画分を得た。又、西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合物も同様に作製した。

(3) 測定方法

実施例 1 で示したブドウ球菌エンテロトキシン A に対する抗血清より精製抗体を得たと同じ方法で、ブドウ球菌エンテロトキシン B に対する精製抗体を得た。

(4) 精製抗ブドウ球菌エンテロトキシン B ウサギ IgG とペルオキシダーゼの結合体の調製

実施例 1 で示したと同じ過ヨウ素酸塩酸化法により、ペルオキシダーゼ結合抗ブドウ球菌エンテロトキシン B ウサギ IgG を得た。

(5) 抗体結合固相の調製

実施例 1 で示した同じ方法で抗体結合固相を得た。

(6) 測定操作

実施例 1 で示したと同じ方法で測定操作を行い、ブドウ球菌エンテロトキシン B の標準曲線はエンテロトキシン A に対する標準曲線と類似の標準曲線が得られた。他のブドウ球菌エンテロトキシンに対しては、交差反応を示さなかつた。

実施例 3.

(I) ブドウ球菌エンテロトキシン C の精製

実施例 1 に記載の方法でブドウ球菌エンテロトキシン C の測定を行つた。エンテロトキシン A の場合と同様な標準曲線が得られ、他のエンテロトキシン A、B、D、E との交差もほとんど認められなかつた。

実施例 4

(I) 精製ブドウ球菌エンテロトキシン D の調製

黄色ブドウ球菌 (*staphylococcus aureus*) 1151-7 NG を用い、実施例 1 と同じ方法で培養し、遠心分離により得た培養上清を 10 倍に濃縮後、pH を 5.7 に調製し、実施例 1 と同じ方法でブドウ球菌エンテロトキシン D を精製した。

(2) 測定材料の調製

実施例 1 に記載の方法で、測定材料を調製した。即ち、抗血清よりの精製 IgG、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合 IgG 等を調製した。

(3) 測定方法

実施例 1 に記載の方法に準じて、ブドウ球菌エンテロトキシン D の測定を行つたところ、実施例 1 と同様な結果が得られた。

実施例 5.

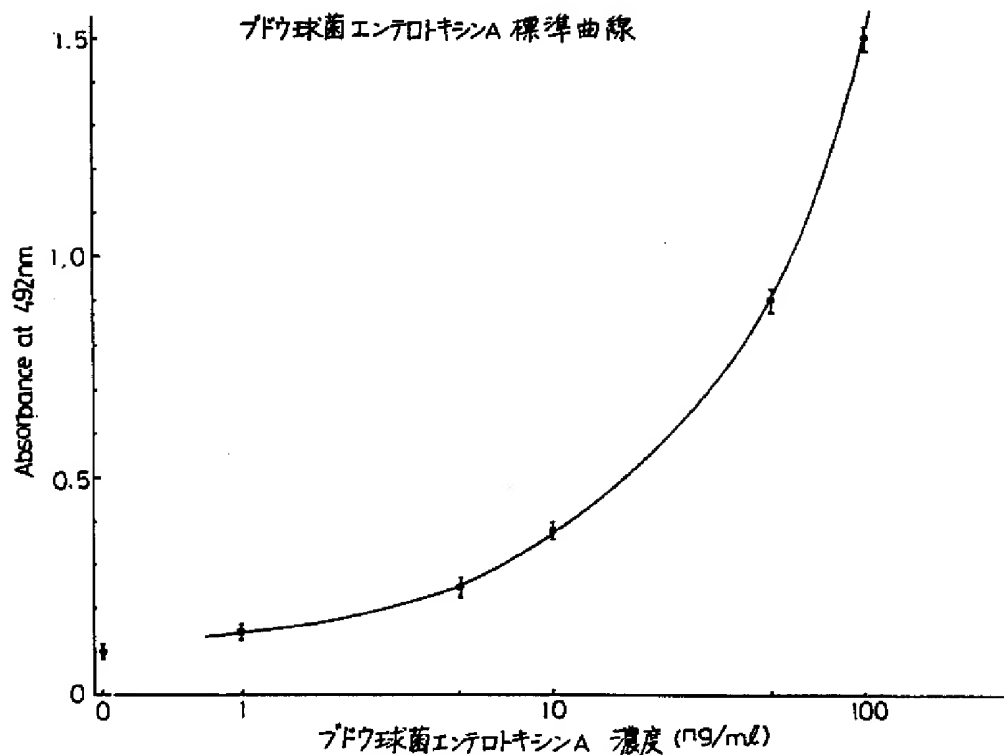
品川らの方法〔品川邦汎、国田信治、阪口玄二：日細誌32、829（1977）〕に従ってブドウ球菌エンテロトキシンEの精製を行い、実施例1に記載の方法に従って抗血清、精製IgG、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合IgGを得、実施例1に記載の方法でブドウ球菌エンテロトキシンEの測定を行ったところ、実施例1と同様な結果が得られ、ブドウ球菌エンテロトキシンAと一部交差反応のあることが認められたが、その測定値にしめる割合はわずかで実用上は問題にならなかった。

4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例1における標準曲線を示す。

特許出願人 東洋紡績株式会社

第1図



手続補正書 (自発)

昭和60年2月19日

特許庁長官 志賀 学 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第

号

(昭和60年2月5日提出)

2. 発明の名称

エンテロトキシンの定量法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

大阪市北区堂島浜二丁目2番8号

(316) 東洋紡績株式会社

代表者 茶谷 周次郎



4. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

5. 補正の内容

(1) 明細書の所定箇所を別紙正誤表の通り訂正

方式
審査

(3) 測定材料の調製

実施例1に記載の方法で測定材料を調製した。
即ち、抗血清よりの精製IgG画分、抗体結合ボール、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合IgG等を調製した。

(4) 測定方法

実施例1に記載の方法に準じて、B.C.エンテロトキシンの測定を行つたところ、実施例1と同じような結果が得られた。」

6. 添付書類

訂正された明細書

第3、4頁

"

第6、7、8頁

"

第13、14、15、

16、17、18頁

する。

(2) 明細書第23頁第11行目と第12行目との間に、次の実施例6を挿入する。

「実施例6

セレウス菌によるエンテロトキシンの検出

(1) セレウス菌によるエンテロトキシン

(Bacillus cereusエンテロトキシン、以下B.C.

エンテロトキシンと略す)の精製

食中毒由来セレウス菌を1%ブドウ糖加Brain-Heart-Insusion(Difco社製)培地で32℃、6時間振とう培養し、遠心上清を得、品川らの方法[大阪府立公衛研所報9, 131(1978)]に従って精製した。

(2) 抗血清の作製

B.C.エンテロトキシンを80μg/ml、0.6mlとフロインドの完全アジュバント0.6mlを等量混合し、ウサギ皮下に免疫した。6~7週後にB.C.エンテロトキシンを30μg/ml、1mlを追加免疫し、最初の注射より1.1週目に全採血を行い、抗血清を作製した。

正 誤 表

頁	行	誤	正
3 1 4			別紙第3、4頁と差し換え
6 1 8			別紙第6、7、8頁と差し換え
13 1 18			別紙第13、14、15、16、17、18頁と差し換え

に食品中に混入したブドウ球菌あるいはセレウス菌の産生する毒素（以下エンテロトキシンと略す）を検出する方法に関するものである。

特に食品衛生検査上、食中毒を生じせしめたエンテロトキシン究明を行う際、食品及び患者材料（吐物）中に存在するエンテロトキシンを正確に定量することにより、食中毒の診断を行うものである。

（従来の技術）

従来からエンテロトキシンの定量法としては次のような方法が行なわれている。食中毒を生じさせたと推定される食品10gを90mlの生理食塩水あるいはリン酸緩衝生理食塩水（以下PBSと略す）にてホモジナイズ後、その0.1mlをマンニツト-食塩-卵黄寒天培地に塗抹し、37℃で24～48時間培養を行い、生じたコロニーを計測して、食品1g中の菌数を求める。食品1g中の菌数が10個以上の場合、本菌による食中毒と推定される。次いで、コアグラゼ産生性を5～7倍希釈ウサギプラズマ0.5mlにプレーンハートインフ

ュージョン培地（以下BHIと略す）培養被検菌0.5mlを加え、3～24時間後、プラズマの凝固又は、フィブリンの析出が認められ場合には黄色ブドウ球菌と同定される。

さらに黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシンを測定する場合、被検菌を3%NZ-アミン培地又はBHI培地で振盪培養し、培養液を遠心後、ミクロスライドゲル内沈降反応法を用いる。その方法は中央の穴にエンテロトキシンを動物に免疫して得た抗血清を入れ、周囲の穴に培養遠心上清をそれぞれ入れ、48時間湿箱中で反応させる。抗血清を入れた穴と培養上清を入れた穴との間に沈降線の形成有無を確認して判定する。あるいはエンテロトキシンに対する抗血清をラテックスに結合させたものを用いて培養上清を倍数希釈し、凝集を示す最高希釈倍数を求める。本方法の最少検出感度によりエンテロトキシンを検出するラテックス凝集反応が用いられている。

（発明が解決しようとする問題点）

ようになった。そこで、従来からエンテロトキシンと呼ばれていた毒素は菌名を付してブドウ球菌エンテロトキシンと呼ぶようになった。本発明はこれらの全てのエンテロトキシンの定量を含有しているものである。

ブドウ球菌食中毒は菌体外毒素により発生する疾患であることが、1930年代に Dacks [Dack, G.W., Cary, W.E., Woolpert, O., Wiggings, H.J. : J. Prev. Med., 4, 167, (1930)] によつて証明され、それ以後このエンテロトキシンが単離精製され、現在このブドウ球菌エンテロトキシンにはA, B, C, D及びEの5つのタイプが存在することも明らかにされている。これらの5つのタイプは、従来の技術の項で述べたようなゲル内沈降反応により、特異的沈降パターンにより区別することが可能であり、5つのタイプの中にも、共通抗原が存在することも又明らかである。これらのエンテロトキシンの分離、精製法は別冊、蛋白質、核酸、酵素11,69 (1976)に詳細に記載されているように培養上清を出発原料にしてCM-セファ

ローズカラムクロマトグラフィー、セファデックスG-100、セファデックスG-75によるゲル濾過を繰返し行う操作が多く用いられる。

本発明に用いられる抗エンテロトキシン抗体は次のようにして得ることができる。すなわち、上記のようにして分離、精製したエンテロトキシンに対する抗血清を得るには、例えばエンテロトキシン80μg/ml, 0.6mlとフロインドの完全アジュバンド0.1mlを等量混合しウサギ皮下に注射し、さらに6～7週後に追加免疫し、最初の免疫より10～11週目で全採血する。得られたエンテロトキシンに対する抗血清の力価、特異性はゲル内沈降反応により検定する。

このようにして得られたエンテロトキシンに対する抗血清から、33%飽和硫酸塩析-DEAEセファローズカラムクロマトグラフィーにより抗体IgG画分を得る。又別法としてプロテインA結合セファローズCL-4Bに抗血清を通し、PBSで洗浄後吸着されたIgGをグリシン-塩酸緩衝液pH2.7を用いて溶出する。溶出後、直ちに2M

トリスアミノメタンで中和後、PBSに対し一夜透析することによりIgGを精製することもできる。さらに動物より得られる抗血清以外、例えばハイブリドーマによるモノクローナル抗体も利用することができる。

このようにして得た抗エンテロトキシンのIgG画分を不溶性担体に結合する方法としては物理吸着を利用しても良く、又通常蛋白質あるいは酵素を不溶化するに用いられる方法を用いて共有結合させても良い。例えば不溶性多糖類を用いる場合であれば、不溶性多糖を異化シアン、過ヨウ素酸ナトリウム、エピクロルヒドリン1,1'-カルボニルジイミダゾール等で活性化して結合反応を行なわせる。又、固相に適當なスぺーサーを導入後、スぺーサーを介して抗エンテロトキシン抗体を結合させても良い。

本発明で使用する抗エンテロトキシン抗体は、IgG画分をそのまま用いても良いが、抗原結合部位のみを分離したものでも良い。即ち、ペパイン、ペプシンなどのプロテアーゼで処理して得ら

キシン抗体の酵素活性に代えて未結合の酵素標識抗エンテロトキシン抗体の酵素活性を測定してもよい。

検体中に存在するエンテロトキシンの量は予め作製した標識曲線により正確にかつ迅速に測定する。

(発明の効果)

本発明では、微生物の産生したエンテロトキシンを簡便で、迅速な操作により正確に測定できる。

(実施例)

次に実施例により本発明を説明する。

(1) 精製ブドウ球菌エンテロトキシンAの調製

品川らの方法〔日細誌30,683,(1975)〕により調製した。即ち黄色ブドウ球菌FRI-722を用い3%NZアミン-プロテインヒドロラーゼ(以下PHPと略す)培地を用い、16~18時間振盪培養し、遠心分離により上清と菌体を分離し、この上清と、8N-HClでpHを5.7に調製した。4倍量の蒸留水で希釈したものを0.01Mリン酸緩衝液pH5.7で平衡化したCM-セファデックスを添加し

バツクロマトを行う。毒素吸着樹脂をカラムにつめpH5.7の0.01Mリン酸緩衝液(pH5.7)で洗浄後、毒素溶出はpH5.7の0.01Mリン酸緩衝液とpH7.5の0.1Mリン酸緩衝液によるグラジエント溶出を行つた。次いで毒素活性画分を集め0.025Mグリシン-NaOH緩衝液(pH8.5)で平衡化したDEAE-セファデックスカラムクロマトにかけ、毒素溶出は0.025Mグリシン-NaOH緩衝液(pH8.5)と0.2NNaClを含む0.05Mグリシン-NaOH緩衝液(pH8.5)によるグラジエント溶出を行なう。さらに、セファデックスG-75ゲル通過後、精製水に対し透析後、凍結乾燥し、精製ブドウ球菌エンテロトキシンAとした。

(2) ブドウ球菌エンテロトキシンAに対する抗血清

ブドウ球菌エンテロトキシンAに対する抗血清は精製ブドウ球菌エンテロトキシンAを初回10μg(0.5ml)とフロインDの完全アジュバンド(0.5ml)を混ぜ、1mlのウサギの背部皮下に接種した。7~9週目にブースターとして同量

(10μg)のブドウ球菌エンテロトキシンAをアジュバンドを加えないで皮下に注射した。力価が最高になつた11~13週に採血した。

(3) 抗ブドウ球菌エンテロトキシンA抗血清よりのIgG画分の調製

得られたブドウ球菌エンテロトキシンAに対するウサギ抗血清をプロテインA結合セファローズCL-4B(ファルマシア製)カラムに通し、波長280nmにおける吸光度が0.050以下になるまで0.01M PBSで洗浄した。次いでプロテインA結合セファローズCL-4Bに結合しているIgG画分を0.1Mグリシン-HCl緩衝液(pH2.7)で溶出した。溶出後、すぐに2Mトリスアミノメタンを用いて中和し、0.01M PBS(pH7.2)に対し透析する。透析後精製抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGとして使用に供した。

(4) F(ab')₂フラグメントの調製

抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGにペプシン(ブタ腸粘膜由来、シグマ社製)10%/V%を加え、37℃、16時間処理し、セファデッ

クスG-200ゲル濾過によりF(ab')₂フラグメントを得た。

(5) 抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGをペルオキシダーゼの結合体の調製

過ヨウ素酸塩酸化法[Nakane, P.K., & Kawaoi, A.; J. Histochem. Cytochem. 22, 1084-1091, (1974)]により、抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGと西洋ワサビペルオキシダーゼ(東洋紡製、グレードI-C)を結合し、セファデックスG-200ゲル濾過により、ペルオキシダーゼ標識抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGを得た。

(6) 抗体結合固相の調製

抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGを経1/4インチポリスチレンボールに物理的に反応により吸着させた。即ち、抗ブドウ球菌エンテロトキシンAウサギIgGを0.1M炭酸緩衝液pH8.5に20~30μg/mlに調製した液にポリスチレンボールを浸漬し、室温4時間、4℃、液放置した。0.01M PBS (pH7.2) で洗浄後、1%牛血清ア

ルブミン(BSA)、0.1% PBS (pH7.2) に使用まで保存した。抗体結合固相は、少なくとも6ヶ月は安定であった。

(7) 測定操作

標準ブドウ球菌エンテロトキシンAは、精製ブドウ球菌エンテロトキシンAを、所定濃度になるように0.01M PBSに溶解調製したものをを用いた。標準ブドウ球菌エンテロトキシンA液、0.1mlあるいは、食中毒を生じさせた食品10gを生理食塩水90mlで抽出した上清(0.1ml)を、内径10mm、高さ30mmの試験管が20個結合したイムノボルトレー(小野薬品工業社製)の中に入れ、正常家兎血清4V/V%を含む、0.01M PBS pH7.2、0.2mlを添加混合後、抗体結合ボールを1個入れ、37℃で、1時間、静置し反応させた。1時間後、アスピレーターを用いて、トレイ中の溶液を吸引除去し、0.01M PBS (pH7.2) を用いて3回洗浄後、0.25V/V% BSAを含む0.01M PBS (pH7.2) で至適活性濃度に調整した。

酵素標識抗体0.25ml加え、37℃、2時間反応さ

せた。反応後、0.01M PBS (pH7.2) を用いて3回洗浄後、新たな試験管ボックス(イムノボール・スピッツボックス)にボールのみ移し、0.02% H₂O₂、0.05% フェニレンジアミン・2HCl

(半井化学社製) 3mg/ml含む、0.2M クエン酸、0.1M リン酸緩衝液pH5.7、0.5mlを加え、暗所、室温で1時間反応させた。1時間後、1N-硫酸2mlを加え酵素反応を停止後、波長492nmでの吸光度を測定した。得られたブドウ球菌エンテロトキシンAの標準曲線を第1図に示す。食品中のブドウ球菌エンテロトキシンAは、この標準曲線より求められた。又、ブドウ球菌エンテロトキシンの他の型、即ちB、C、D、Eに対する交差反応は、E 20ng/mlに対し2%程度の交差反応を示した。しかし他のB、C、Dに対してはエンテロトキシン1,000ng/ml程度でも反応は示さなかった。

実施例 2

手続補正書(自発)

昭和60年11月8日

特許庁長官 宇賀道郎 殿



1. 事件の表示

昭和60年特許願第20570号

2. 発明の名称

エンテロトキシンの定量法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

大阪市北区堂島浜二丁目2番8号

(316) 東洋紡績株式会社

代表者 瀧澤三郎



4. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

5. 補正の内容

(1) 明細書第19頁第2~3行目

方式
審査



- 「実施例」を「実施例 1」に訂正する。
- (2) 同第 20 頁第 2 行目
「糖製抗体」を「精製抗体」に訂正する。
- (3) 同第 7 頁
(昭和 60 年 2 月 19 日提出の手続補正書
別紙第 7 頁の第 9 行目)
「0.1 ml」を「0.8 ml」に訂正する。
- (4) 同第 13 頁
(昭和 60 年 2 月 19 日提出の手続補正書
別紙第 13 頁の第 18 行目)
「上清と」を「上清を」に訂正する。
- (5) 同第 14 頁
(昭和 60 年 2 月 19 日提出の手続補正書
別紙第 14 頁の第 2 行目)
「(pH5.7)」を削除する。
- (6) 同第 16 頁
(昭和 60 年 2 月 19 日提出の手続補正書
別紙第 16 頁の第 15 行目)
「物理的に」を「物理的な」に訂正する。
- (7) 同第 18 頁

- (昭和 60 年 2 月 19 日提出の手続補正書
別紙第 18 頁の第 19 行目)
「液放置した。」を「一夜放置した。」に
訂正する。
- (8) 同第 18 頁
(昭和 60 年 2 月 19 日提出の手続補正書
別紙第 18 頁の末行)
「啓」を「で」に訂正する。
- (9) 同第 17 頁
(昭和 60 年 2 月 19 日提出の手続補正書
別紙第 17 頁第 1 行目)
「0.1%」の次に「アジ化ナトリウム
(NaH₂)」を含む「0.01M」を挿入する。

以 上